



Alexandre Manuel Pedroso Botas

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Membranas Fluorescentes para fototerapia regenerativa: produção e caracterização

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Isabel Ferreira, FCT/UNL
Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, FCT/UNL

Júri:

Presidente:	Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca
Arguente:	Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques
Vogais:	Prof. Doutora Isabel Maria das Mercês Ferreira
	Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Membranas Fluorescentes para fototerapia regenerativa: produção e caracterização

©2012 – Todos os direitos reservados. Alexandre Manuel Pedroso Botas. Faculdade de Ciências e Tecnologias. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologias e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à ajuda de várias pessoas, os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus orientadores, a Professora Doutora Isabel Ferreira e o Professor Doutor João Paulo Borges pela oportunidade que me deram de realizar este trabalho e pela disponibilidade, atenção e apoio.

À Mestre Ana Baptista pelo acompanhamento e sugestões dadas ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Joaquim Leitão, da Universidade de Aveiro, pelas medidas da fotoluminescência.

A todos os que comigo partilharam os laboratórios, do Departamento de Ciência dos Materiais e CENIMAT/I3N, nestes últimos meses, em especial aos que me ajudaram com o funcionamento de alguns aparelhos.

A todos os colegas, amigos e professores que fizeram parte da minha vida nestes últimos cinco anos.

Por último, agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional.

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como objetivo a produção de membranas com fluorescência na gama de comprimentos de onda do visível, visando possíveis aplicações em fototerapia regenerativa.

Para a produção das membranas fluorescentes utilizaram-se diferentes técnicas de síntese e incorporação de nanopartículas de ouro e prata em membranas poliméricas, de acetato de celulose, policaprolactona e polivinilpirrolidona, obtidas por eletrofiação.

A fluorescência das membranas foi verificada por microscopia ótica com acessório de fluorescência. A espectroscopia ultravioleta/visível e a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizadas para caracterizar as soluções de nanopartículas e a microscopia eletrônica de varrimento para analisar a morfologia das membranas.

Os melhores resultados em termos de fotoluminescência foram obtidos com uma membrana de polivinilpirrolidona com nanopartículas de prata incorporadas. As medidas de fotoluminescência revelaram que esta membrana emite radiação numa gama de comprimentos de onda dos 550 aos 650 nm, quando excitada por um LASER UV de 325 nm. Também foi estudada a variação na intensidade do pico de fluorescência ao longo do tempo mantendo a excitação LASER durante um período de sete horas.

Termos chave: membranas fluorescentes; nanopartículas; nanofibras poliméricas; eletrofiação.

Abstract

The aim of this work was to produce fluorescent membranes in the visible wavelengths range, aiming potential applications in regenerative phototherapy.

For the production of fluorescent membranes several techniques for synthesis and incorporation of gold and silver nanoparticles in polymeric membranes of cellulose acetate, polycaprolactone and polyvinylpyrrolidone, obtained by electrospinning were used.

The membranes' fluorescence was verified by optical microscopy with a fluorescence accessory. Spectroscopy UV/VIS and transmission electron microscopy were used to characterize the nanoparticles solutions and scanning electron microscopy to analyse the surface morphology of the membranes.

The best results in terms of photoluminescence were obtained with a polyvinylpyrrolidone membrane containing silver nanoparticles. The photoluminescence measurements showed that this membrane emits radiation in wavelength range of 550 to 650 nm when excited by a 325 nm UV LASER. The variation of the fluorescence peak intensity for a period of seven hours was also studied.

Keywords: fluorescent membranes; nanoparticles; polymeric nanofiber; electrospinning.

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Abs	Absorvância
AC	Acetato de Celulose
CdSe	Seleneto de Cádmio
CM	Cloreto de Metileno
DMAc	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
EDS	Energy Dispersive X-Ray Microscopy (Espectroscopia de raio X por dispersão de energia)
I_f	Intensidade final
I_i	Intensidade inicial
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	Light Emitting Diode
LLL	Low-level laser (Laser de baixa intensidade)
PCL	Policaprolactona
PVP	Polivinilpirrolidona
R^2	Fator de correlação das variáveis x e y
SEM	Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varrimento)
TEM	Transmission Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Transmissão)
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
λ	Comprimento de onda
λ_0	Comprimento de onda no vazio
ν	Frequência
ρ	Resistividade
σ	Condutividade

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	vi
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xii
Introdução.....	1
Capítulo 1: Fundamentos Teóricos	3
1.1. Fototerapia Regenerativa	3
1.2. Fluorescência	5
1.3. Nanopartículas	6
1.3.1. Nanopartículas de ouro	7
1.3.2. Nanopartículas de prata	7
1.4. Polímeros	8
1.4.1. Polivinilpirrolidona (PVP).....	9
1.4.2. Policaprolactona (PCL)	9
1.4.3. Acetato de Celulose (AC)	10
1.5. Eletrofiação.....	10
Capítulo 2: Materiais e Métodos.....	13
2.1. Métodos de produção das nanopartículas	13
2.1.1. Produção das nanopartículas de prata	13
2.1.2. Produção das nanopartículas de ouro	15
2.2. Métodos de produção das membranas.....	16
2.2.1. Membranas sem nanopartículas	16
2.2.2. Membranas com nanopartículas	17
2.3. Métodos de caracterização	18
2.3.1. Espectroscopia UV/VIS	18
2.3.2. Microscopia Ótica com Fluorescência.....	18
2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	19
2.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	19
2.3.5. Medição da Condutividade	19
2.3.6. Medição da Fotoluminescência	19
Capítulo 3: Resultados e Discussão	21
3.1. Estudo das nanopartículas	21

3.1.1. Nanopartículas de prata	21
3.1.1.1. Nanopartículas produzidas utilizando NaBH ₄ como agente redutor	21
3.1.1.1.1. Influência da concentração dos reagentes	23
3.1.1.1.2. PVP como agente estabilizante	26
3.1.1.2. Nanopartículas produzidas utilizando PVP em etanol como agente redutor ..	28
3.1.1.2.1. Influência da concentração dos reagentes	29
3.1.1.2.2. Influência da exposição à radiação UV	31
3.1.1.3. Nanopartículas produzidas utilizando DMF como agente redutor	32
3.1.2. Nanopartículas de ouro	33
3.2. Estudo das membranas produzidas por eletrofiação	35
3.2.1. Membranas de PVP	35
3.2.1.1. Membranas de PVP sem nanopartículas	35
3.2.1.2. Membrana de PVP com nanopartículas de ouro.....	37
3.2.1.3. Membranas de PVP com nanopartículas de prata.....	38
3.2.2. Membranas de PCL.....	53
3.2.2.1. Membranas de PCL sem nanopartículas	53
3.2.2.2. Membrana de PCL com nanopartículas de ouro.....	55
3.2.2.3. Membranas de PCL com nanopartículas de prata	57
3.2.3. Membranas de AC.....	64
3.2.3.1. Membrana de AC sem nanopartículas	64
3.2.3.2. Membranas de AC com nanopartículas de ouro	64
3.2.3.3. Membranas de AC com nanopartículas de prata	68
Capítulo 4: Conclusão e Perspectivas Futuras.....	71
Referências	74

Índice de Figuras

Figura 1.1: Diagrama das transições responsáveis pelos fenómenos de fluorescência e de fosforescência.	6
Figura 1.2: Classificação quanto à forma de nanopartículas constituídas por metais.....	7
Figura 1.3: Representação esquemática da ação do BH_4^- como agente estabilizador.	8
Figura 1.4: Estrutura molecular do PVP.....	9
Figura 1.5: Estrutura molecular do PCL.....	9
Figura 1.6: Estrutura molecular do AC.....	10
Figura 1.7: Esquema da montagem de um sistema para eletrofiação.	11
 Figura 2.1: Montagem utilizada na técnica de Eletrofiação.	16
 Figura 3.1: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 8 e 9.	22
Figura 3.2: Imagens das nanopartículas de prata na solução 8 obtidas por microscopia eletrónica de transmissão.	22
Figura 3.3: Soluções 8 e 9 preparadas, respetivamente, com $[\text{AgNO}_3]$ de 1 e 2 mM, mas mantendo o rácio $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3] \cong 2$	23
Figura 3.4: Soluções 1, 2 e 3 com diferentes rácios $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ (e $[\text{NaBH}_4]$ constante)...	24
Figura 3.5: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 1, 2 e 3.....	25
Figura 3.6: Soluções 4 e 5 preparadas com $[\text{AgNO}_3]$ constante, mas com diferentes rácios $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$, respetivamente 3.7 e 6.5.....	25
Figura 3.7: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 4 e 5 preparadas, respetivamente, com um rácio $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ de 3.7 e 6.5, e $[\text{AgNO}_3]$ constante.....	26
Figura 3.8: Soluções 8 e 9, com adição de agente estabilizante (PVP).	26
Figura 3.9: Soluções 1, 2 e 3, com adição de agente estabilizante (PVP).	27
Figura 3.10: Soluções 4 e 5, com adição de agente estabilizante (PVP).	27
Figura 3.11: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 8 e 9 com adição de agente estabilizante (PVP).	27
Figura 3.12: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 1, 2 e 3 com adição de agente estabilizante (PVP).	28
Figura 3.13: Espectros de absorção ao longo do tempo para as soluções 4 e 5 com adição de agente estabilizante (PVP).	28
Figura 3.14: Espectros de absorção variando a concentração de AgNO_3 , para a mesma concentração de 50 g/l de PVP (10.000 g/mol) em etanol.	29
Figura 3.15: Imagens das nanopartículas de prata, na solução E1 preparada com o 2º protocolo, obtidas por microscopia eletrónica de transmissão.	30
Figura 3.16: Espectros de absorção variando a concentração de AgNO_3 , para a mesma concentração de 100 g/l de PVP (10.000 g/mol) em etanol.	30

Figura 3.17: Espectros de absorção variando a concentração de PVP (10.000 g/mol), para a mesma concentração de 2.5 g/l de AgNO_3 em etanol.	31
Figura 3.18: Espectros de absorção, da solução E1 e de uma solução em que o etanol foi substituído por água, após irradiação com UV por diferentes períodos.	32
Figura 3.19: Soluções de nanopartículas preparadas com o 3º protocolo, que utiliza DMF como agente redutor.	33
Figura 3.20: Soluções coloidais de nanopartículas de ouro..	33
Figura 3.21: Espectros de absorção das soluções coloidais de nanopartículas de ouro..	34
Figura 3.22: Imagens das nanopartículas de ouro na solução 1 obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.	34
Figura 3.23: Soluções e polímeros, em pó, utilizados para a preparação das duas membranas expostos a luz branca e a luz UV com 365 nm.....	37
Figura 3.24: Imagens de SEM de membrana de PVP produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	40
Figura 3.25: Análise elementar obtida por EDS da membrana de PVP, produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	40
Figura 3.26: Distribuição espacial dos principais elementos contidos na membrana da figura 3.25.....	41
Figura 3.27: Fluorescência do filme produzido a partir de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	43
Figura 3.28: Variação espectral da fotoluminescência da membrana com o aumento do tempo de exposição desta à radiação do laser de 325 nm.....	45
Figura 3.29: Variação espectral da fotoluminescência da membrana com o aumento do tempo de exposição desta à radiação do laser de 456 nm.....	46
Figura 3.30: Variação espectral da fotoluminescência da membrana com o aumento do tempo de exposição desta à radiação do laser de 532 nm.....	46
Figura 3.31: Variação relativa de fotoluminescência da membrana com o aumento do tempo de exposição desta à radiação dos lasers.	47
Figura 3.32: Corrente versus tensão obtida para a membrana de PVP (produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3).	47
Figura 3.33: Análise elementar obtida por EDS da membrana de PVP produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 10% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	50
Figura 3.34: Distribuição elementar obtida por EDS. Membrana de PVP produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 10% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3).	50
Figura 3.35: Análise elementar obtida por EDS, da membrana de PVP produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 20% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	50

Figura 3.36: Distribuição elementar obtida por EDS. Membrana de PVP produzida por eletrofiliação, de uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 20% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3	51
Figura 3.37: Polímeros utilizados para a preparação das membranas expostos a luz branca e a luz UV com 365 nm.	54
Figura 3.38: Solução 13% (p/v) PCL em CM e DMF a 90:10% (v/v) e água expostas a luz branca e a luz UV com 365 nm.	55
Figura 3.39: Imagens de SEM de uma membrana de PCL produzida por eletrofiliação, a partir de uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v) imersa durante uma semana numa solução coloidal de nanopartículas de ouro.....	55
Figura 3.40: Distribuição elementar obtida por EDS. Membrana de PCL produzida por eletrofiliação, a partir de uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v), imersa durante uma semana numa solução coloidal de nano partículas de ouro.	56
Figura 3. 41: Imagens de SEM de uma membrana de PCL produzida por eletrofiliação, a partir de uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v), imersa durante duas semanas numa solução coloidal de nanopartículas de prata.	58
Figura 3.42: Análise de EDS da membrana de PCL produzida por eletrofiliação, a partir de uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v), imersa durante duas semanas numa solução coloidal de nanopartículas de prata.	58
Figura 3.43: Imagem de SEM da membrana de PCL produzida por eletrofiliação, de uma solução de 13% (p/v) PCL e 0.06 M AgNO_3 em DMF e CM a 90:10% (v/v).	61
Figura 3.44: Análise elementar obtida por EDS na membrana de PCL produzida por eletrofiliação, de uma solução de 13% (p/v) PCL e 0.06 M AgNO_3 em DMF e CM a 90:10% (v/v).	61
Figura 3.45: Distribuição espacial dos elementos detetados por EDS. Membrana de PCL produzida por eletrofiliação, de uma solução de 13% (p/v) PCL e 0.06 M AgNO_3 em DMF e CM a 90:10% (v/v).	62
Figura 3.46: Imagens de SEM da membrana de AC produzida por eletrofiliação, de uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v), imersa durante uma semana numa solução coloidal de nanopartículas de ouro.....	65
Figura 3.47: Análise elementar por EDS da membrana de AC produzida de uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v), imersa durante uma semana numa solução coloidal de nanopartículas de ouro.	65
Figura 3.48: Distribuição espacial dos elementos detetados por EDS. Membrana de AC produzida por eletrofiliação, de uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v), imersa durante uma semana numa solução coloidal de nanopartículas de ouro.....	66
Figura 3.49: Imagens de SEM da membrana de AC produzida por eletrofiliação, de uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v) imersa durante duas semanas numa solução coloidal de nanopartículas de prata.	68
Figura 3.50: Imagens de SEM da membrana de AC produzida por eletrofiliação, de uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v) onde as nanopartículas de prata foram incorporadas durante a preparação da solução coloidal de nanopartículas.	69

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Frequências e comprimentos de onda para várias cores, no vazio.	3
Tabela 1.2: Sistemas de tratamento por fototerapia aplicados na medicina regenerativa.	4
Tabela 1.3: Principais efeitos dos parâmetros da eletrofiação na morfologia das fibras.	12
Tabela 2.1: Concentrações de AgNO_3 e NaBH_4 nas soluções reagentes.	14
Tabela 2.2: Composição das diversas soluções de nanopartículas de prata, em etanol, sintetizadas com o 2º protocolo.	15
Tabela 2.3: Características das soluções utilizadas para produzir as membranas sem nanopartículas e parâmetros utilizados na eletrofiação.	17
Tabela 3.1: Concentrações de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nas soluções utilizadas para preparar as soluções 1 e 2.	33
Tabela 3.2: Fluorescência de membranas sem nanopartículas produzidas por eletrofiação, utilizando 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) sem e com 5% (p/v) de baixo peso molecular (10.000 g/mol).	36
Tabela 3.3: Fluorescência da membrana de PVP preparada com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) com e sem nanopartículas de ouro (solução 1).	38
Tabela 3.4: Fluorescência da membrana de PVP preparada com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) com e sem nanopartículas de prata.	39
Tabela 3.5: Fluorescência da membrana de PVP produzida com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) e 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) em etanol, sem e com nanopartículas de prata (14.7 mM de AgNO_3).	42
Tabela 3.6: Fluorescência da membrana de PVP (preparada com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3 em etanol), reticulada e não reticulada.	44
Tabela 3.7: Condutividade elétrica das membranas de PVP.	48
Tabela 3.8: Imagens de SEM de membranas de PVP produzidas por eletrofiação, como uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3 em etanol com duas concentrações de PVP (10.000 g/mol).	49
Tabela 3.9: Fluorescência das membranas de PVP produzidas por eletrofiação, com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO_3 em etanol e duas concentrações de PVP (10.000 g/mol).	52
Tabela 3.10: Fluorescência das membranas preparadas com uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF em duas proporções diferentes.	53
Tabela 3.11: Fluorescência das Membranas de PCL, produzidas com uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v): com e sem nanopartículas de ouro depositadas por imersão.	57
Tabela 3.12: Fluorescência das membranas de PCL (preparada com uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v)), com e sem nanopartículas de prata depositadas por imersão.	59

Tabela 3.13: Fluorescência das membranas de PCL (preparada com uma solução de 13% (p/p) PCL em CM e DMF a 75:25% (v/v)), com e sem nanopartículas de prata.....	60
Tabela 3.14: Fluorescência das membranas de PCL (preparada com uma solução de 13% (p/v) PCL em DMF e CM a 90:10% (v/v)), sem e com duas concentrações diferentes de fonte de prata (0.03 M AgNO ₃ e 0.06 M AgNO ₃)..	63
Tabela 3.15: Resultados das medições de condutividade das membranas de PCL.....	64
Tabela 3.16: Fluorescência das membranas de AC (preparada com uma solução de 17% AC (p/v) em acetona e DMAc (75:25%) (v/v)), sem e com nanopartículas de ouro.....	67
Tabela 3.17: Fluorescência das membranas de AC, sem e com nanopartículas de prata, produzidas por eletrofiação.....	70
Tabela 4.1: Variação da intensidade do pico de absorção das soluções em que se utilizou NaBH ₄ como agente redutor do AgNO ₃ .	71
Tabela 4.2: As mesmas soluções da tabela 4.1 com adição de 1 gota de uma solução aquosa de PVP 0.3% (p/v) (10.000 g/mol) por cada 5 ml de solução de nanopartículas.	72
Tabela 4.3: Variação da intensidade do pico de absorção das soluções em que se utilizou PVP (10.000 g/mol) em etanol como agente redutor do AgNO ₃ .	72
Tabela 4.4: Fluorescência da membrana de PVP produzida com uma solução de 18% (p/v) PVP (1.300.000 g/mol), 5% (p/v) PVP (10.000 g/mol) e 14.7 mM de AgNO ₃ em etanol.....	73

Introdução

A radiação emitida por LASERS de baixa potência e LEDS, numa gama de comprimentos de onda que vai do infravermelho ao ultravioleta, é utilizada em fototerapia para estimular a regeneração de diferentes tecidos [Fedri de Sousa, 2011].

Este trabalho tem como objetivo produzir membranas de nanofibras com fluorescência na gama dos comprimentos de onda da luz visível. As membranas formadas por nanofibras poliméricas produzidas por eletrofiação foram funcionalizadas com nanopartículas de ouro e prata, a fim de modificar/incrementar a sua fluorescência. Este trabalho é assim uma primeira etapa visando uma possível aplicação em fototerapia. Para tal a intensidade de luz emitida, a uniformidade e o comprimento de onda de emissão serão as características a controlar.

As propriedades óticas de vários tipos de nanopartículas têm revelado potencial em várias áreas, como a dos biossensores ou a das membranas luminescentes. Exemplo disso são as nanopartículas de CdSe que têm uma forte fluorescência e cuja incorporação numa matriz de celulose deu origem a uma membrana onde se observa a emissão de luz verde quando excitada por luz ultravioleta [R. G. Haverkamp, 2010; Yang, 2012].

As nanopartículas de ouro e prata apresentam propriedades óticas relevantes, como a fluorescência, a qual varia consoante as suas dimensões e formas [Hua He, 2008; Maali, 2003]. Além das propriedades óticas, estas nanopartículas, sobretudo as de prata, apresentam atividade antimicrobiana sendo utilizadas para impedir infeções durante o tratamento de queimaduras ou para prevenir a colonização de material médico por bactérias [Hernández-Sierra, 2008; Feitor, 2010].

Estes factos justificam a escolha das nanopartículas de ouro e prata como elementos fluorescentes a integrar numa matriz polimérica. A escolha do polímero tem como critérios a sua interação com o organismo e a técnica utilizada para o associar às nanopartículas.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

Tendo em vista a futura utilidade do trabalho realizado, nomeadamente na possível aplicação das membranas fluorescentes em fototerapia regenerativa, no capítulo 1 é realizado um enquadramento sobre os fundamentos teóricos, incluindo uma revisão sobre a utilização de LASERS e LEDS em fototerapia, com destaque para as aplicações, comprimentos de onda e intensidades das radiações aplicadas. Este capítulo inclui também uma abordagem sobre o fenómeno da fluorescência e sobre a técnica utilizada para a produção das membranas (a eletrofiação).

O capítulo 2 descreve os materiais e métodos utilizados para a produção das membranas e nanopartículas fluorescentes, assim como os diversos métodos utilizados na sua caracterização.

No capítulo 3 é feita a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

Por último, no capítulo 4 são apresentadas as principais conclusões do trabalho desenvolvido, e é apresentada uma perspetiva sobre qual a abordagem a seguir numa possível continuação da investigação.

Capítulo 1: Fundamentos Teóricos

1.1. Fototerapia Regenerativa

A fototerapia é uma técnica terapêutica em que é utilizada a exposição à radiação não ionizante [Jin, 2011; Ledo, 2000].

Existem descrições, com mais de 2000 anos, sobre a utilização da fototerapia pelos egípcios, que filtravam a luz solar com panos coloridos, acreditando na sua capacidade para curar doenças dermatológicas [Werneck, 2002]. Outras descrições, datadas de 1400, referem a utilização, pelos hindus, de plantas medicinais em combinação com a exposição ao sol como tratamento do vitiligo [Duarte, 2006].

A fototerapia começou a ser estudada e utilizada, na medicina, com maior interesse a partir de 1903, quando Niels Finsen recebeu o prémio Nobel pelo sucesso no tratamento do lúpus eritematoso com radiação UV [Duarte, 2006; Werneck, 2002].

São utilizadas em fototerapia diversas gamas de comprimentos de ondas, desde a radiação UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm) até à infravermelha próxima do visível (780-3000nm), passando pela radiação visível, cujas frequências e comprimentos de onda aproximados para as várias cores estão na tabela 1.1 [Hecht, 2002; Jin, 2011; Szacilowski, 2005].

Tabela 1.1: Frequências e comprimentos de onda para várias cores, no vázio [Hecht, 2002].

Cor	λ_0 (nm)	ν (THz)
Vermelho	780-622	384-482
Laranja	622-597	482-503
Amarelo	597-577	503-520
Verde	577-492	520-610
Azul	492-455	610-659
Violeta	455-390	659-769

Os tipos de fontes de luz mais utilizados são a luz solar, os lasers de baixa intensidade (LLL) e os LEDs [Jin, 2011].

Por definição os LLL não provocam um aumento da temperatura do tecido irradiado superior a 0.1-0.5°C. [Wu, 2008].

Os novos aparelhos desenvolvidos, que utilizam os LEDs como fonte de luz para a fototerapia, permitem a aplicação da radiação em áreas alargadas [Caetano, 2008].

Apesar de os dispositivos baseados em LEDs serem mais baratos de produzir, continuam a ser utilizados em aparelhos pouco confortáveis de utilizar. Uma das possibilidades para ultrapassar estas limitações, poderá ser o desenvolvimento de novas fontes de luz mais flexíveis e descartáveis, tirando proveito das características luminescentes de alguns nanomateriais [Allison, 2008].

A luz laser apresenta características como: monocromaticidade (os fotões têm o mesmo comprimento de onda), coerência (os fotões são emitido de forma síncrona) e colimação (a luz é unidirecional, tendo um desvio angular muito pequeno).

Apesar dos LEDs não terem a coerência dos LASERs e de não emitirem apenas num único comprimento de onda, estas características não são limitativas uma vez que a colimação e a coerência sofrem uma diminuição nos primeiros extratos de tecido [Andrade 2010; Silva, 2009].

Capítulo 1: Fundamentos Teóricos

A resposta biológica é determinada pela absorção dos fótons, pelos tecidos, independentemente da sua fonte de emissão, o que faz com que a luz coerente e a luz incoerente possam provocar a mesma resposta, desde que os parâmetros como o comprimento de onda, a dosagem e a intensidade sejam ajustados [Silva, 2009].

A aplicação clínica da fototerapia tem aumentado nos últimos anos, estando provada a sua capacidade para acelerar significativamente a regeneração de lesões crónicas da pele [Jin, 2011].

Existe uma grande diversidade de estudos sobre aplicações para a fototerapia, fontes de radiação e gama de energias a depositar nos tecidos. Os resultados desses estudos encontram-se compilados em diversos artigos de revisão. Na tabela 1.2 apresenta-se um resumo desses resultados [Andrade, 2010; Duarte, 2006; Jin, 2011; Ledo, 2000; O'Riordan, 2005].

Tabela 1.2: Sistemas de tratamento por fototerapia aplicados na medicina regenerativa (adaptado de Jin, 2011; Minatel, 2009).

Tipo de luz	Fonte (λ)	Energia	Resultados
Infravermelha	LLL (830 nm)	53 mW/cm ²	Aceleração da cicatrização de feridas cutâneas de ratos.
Vermelha	LLL (670 nm)	4 J/cm ²	Diminuição nas dimensões de úlceras de ratos.
Vermelha	LED (670 nm)	—	Ajuda na reparação de ferida pós-operatória.
Azul	LED (470 nm)	—	Aumento nos níveis de queratina-10 mRNA em ratos.
Infravermelha	LLL (810 nm)	150 mW/cm ²	Maior crescimento dos axónios de ratos tratados com luz.
Vermelha	LLL (660 nm)	4 J/cm ²	Resultados positivos na recuperação funcional do nervo ciático de ratos, após esmagamento.
Infravermelha	LLL (780 nm)	250 mW/cm ²	Melhoria na função dos nervos de pacientes com lesão do nervo periférico.
Vermelha	LED (660 nm)	9 mW/cm ²	Reforço na capacidade metabólica de diferentes tipos de fibras musculares.
Vermelha e Infravermelha	LEDs (660 e 890 nm)	3 J/cm ²	Aceleração na cicatrização de úlceras em pacientes diabéticos.

A dose de energia a depositar num tecido por unidade de superfície depende do quadro clínico do paciente, mas a maioria dos autores afirma que a energia a depositar deve situar-se entre 1 e 6 J/cm². Nesse intervalo os autores defendem que se consegue um efeito anti-inflamatório, antiálgico, regenerativo e circulatório. Existem estudos onde se utilizaram valores inferiores a 1 J/cm² e onde o tratamento por fototerapia obteve resultados positivos [Lin, 2010].

Uma densidade de energia superior a 12 J/cm² poderá ter um efeito inibitório [Silva, 2009].

No tratamento de algumas lesões como úlceras ou queimaduras, onde a fototerapia promove a reparação dos tecidos, também são utilizadas substâncias com características antimicrobianas, como a sulfadiazina de prata (composta de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio), como forma de evitar as infecções a que os pacientes com estas lesões são suscetíveis [Caetano, 2008; Minatel, 2009].

1.2. Fluorescência

A luminescência é o fenómeno que consiste na emissão de luz por um sistema, após receber energia. Um fenómeno de luminescência pode ser classificado consoante a origem da energia de excitação do sistema: quimioluminescência se for uma de reação química; triboluminescência se for uma ação mecânica como a fricção, a quebra ou o esmagamento; radioluminescência se for uma substância radioativa; eletroluminescência se for uma descarga elétrica ou fotoluminescência se for luz numa gama de comprimentos de onda do infravermelho ao ultravioleta [Moreira, 1980; Williams, 1981].

Nos fenómenos de luminescência faz-se a distinção entre fluorescência e a fosforescência. Na fluorescência a desexcitação é rápida (tempos inferiores a 10^{-7} s), o que faz com que a emissão das radiações de luminescência coincida com a duração da excitação, pelas radiações incidentes. Na fosforescência existe um atraso apreciável (nalguns casos, de segundos, de minutos ou mesmo horas) entre a excitação por radiação e a emissão de radiação [Hecht, 2002; Moreira, 1980].

Os fenómenos de desexcitação radiativos, como a fluorescência e fosforescência, competem ou são complementados por outros processos não radiativos. A fluorescência acontece quando a taxa de decaimento radiativo é pelo menos comparável à dos outros fenómenos não radiativos.

Nos fenómenos radiativos um eletrão, de um átomo ou molécula, é promovido a um estado excitado pela radiação incidente e ao regressar ao estado fundamental emitem um fóton. Se o eletrão, do átomo ou molécula, decai de um estado singleto para o estado fundamental trata-se de um fenómeno de fluorescência, se decair de um estado tripleto para o estado fundamental trata-se de fosforescência, como se observa na figura 1.1 [Grova, 2007; Moreira, 1980].

Uma vez que a transição do estado fundamental para o estado tripleto de menor energia é uma transição proibida, o estado tripleto de menor energia é obtido por uma transição não radiativa chamada cruzamento intersistemas no qual o spin do eletrão excitado é invertido, permitindo a sua passagem a um estado tripleto [Grova, 2007]. Como a taxa de cruzamento intersistemas é baixa, a fosforescência é um processo de emissão prolongado.

Uma vez que os estados tripleto estão associados a níveis de energia mais baixos, as emissões de fosforescência tem comprimentos de onda maiores do que as de fluorescência [Williams, 1981].

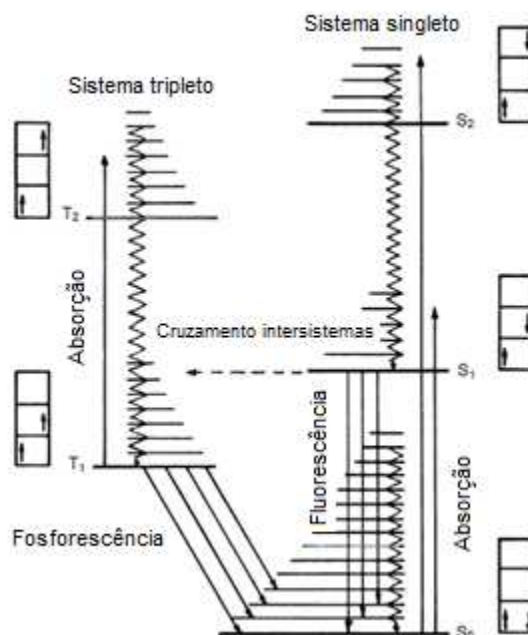


Figura 1.1: Diagrama das transições responsáveis pelos fenómenos de fluorescência e de fosforescência (adaptado de Williams, 1981).

Fatores como a temperatura, o pH, a viscosidade, o solvente ou a presença de outras espécies podem ter um efeito importante nas características da luminescência de uma substância. A presença de determinados grupos substituintes numa molécula também afeta a intensidade e tipo de luminescência. Os grupos hidroxilo (-OH), metoxi (-OR), amino (-NR₂), cianeto (-CN) e sulfónico (-SO₃H) tendem a amplificar a fluorescência, enquanto os halogéneos e grupos carboxilo (-COOH) tendem a diminuí-la [Coelho, 2004].

1.3. Nanopartículas

A classificação de nanopartícula é atribuída a partículas com dimensões superiores a 1 nm e inferiores a 100 nm. Sistemas onde partículas com estas dimensões se encontram dispersas são classificados como soluções coloidais [Prista, 2003].

Os nanomateriais podem ser classificados como materiais compactos ou como nanodispersões, consoante a organização estrutural das nanopartículas que os constituem. Na figura 1.2, estão representadas as diferentes formas possíveis para nanopartículas constituídas por metais.

Se tiverem como elementos estruturais unidades nanométricas compactas, que se apresentam homogéneas à escala macroscópica, classificam-se como materiais compactos, se forem formados por nanopartículas dispersas, num meio, classificam-se como nanodispersões [Carvalho, 2011].

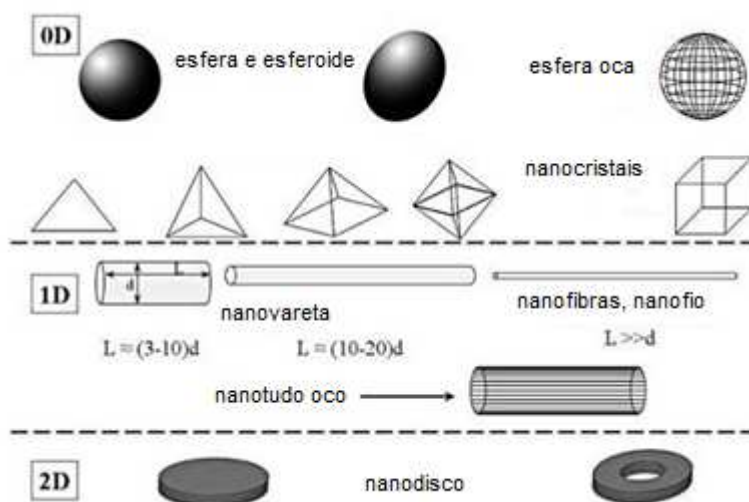


Figura 1.2: Classificação quanto à forma de nanopartículas constituídas por metais [Carvalho 2011].

As nanopartículas metálicas, como as de ouro e prata têm sido estudadas devido às suas potenciais aplicações em áreas como o desenvolvimento de fármacos, a microeletrônica, a ótica e a imagem médica [Jiang, 2005; Kim, 2009].

Existe uma dependência, entre o tamanho e forma das nanopartículas metálicas e a sua fluorescência. Esta relação é mais significativa para nanopartículas com diâmetro entre 1 e 10 nm e não se verifica para materiais com dimensões macroscópicas constituídos pelo mesmo metal [Jana, 2001; Neto, E., 2010].

1.3.1. Nanopartículas de ouro

Os métodos para a produção de nanopartículas podem ser químicos e físicos e alguns deles envolvem a utilização de compostos químicos tóxicos e de equipamento dispendioso [Sironmani, 2011].

As nanopartículas de ouro são biocompatíveis e as suas propriedades óticas dependem do seu tamanho e forma [Bhattacharyya, 2011; R. G. Haverkamp, 2010].

O processo químico de síntese das nanopartículas de ouro é simples e rápido e baseia-se na redução de um sal de ouro pela adição de um agente redutor que provoca um fenómeno de nucleação, em que os átomos de ouro reduzido se aglomeram formando as nanopartículas [Holtz, 2009].

1.3.2. Nanopartículas de prata

A prata é de entre os metais, aquele que apresenta uma condutividade elétrica e térmica mais elevada [Jiang, 2005]. Quando comparadas com outras soluções de nanopartículas metálicas, as de prata têm uma maior toxicidade contra microorganismos: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Au} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Sn}$ [Guggenbichler, 1999].

À semelhança do que se passa com as nanopartículas de ouro, as nanopartículas de prata podem ser produzidas por adição de uma agente redutor a um composto precursor.

O AgNO_3 é um dos compostos mais utilizados como fonte dos átomos de prata, uma vez que, comparativamente a outros compostos como o iodeto de prata ou o perclorato de prata,

apresenta uma reação mais lenta e constante, permitindo um melhor controle das características das nanopartículas [Neto, E., 2010].

O borohidreto de sódio é um dos compostos com capacidade de reduzir o nitrato de prata, através da seguinte reação [Solomon, 2007]:



A Dimetilformamida e a Polivinilpirrolidona também têm capacidade para reduzir o nitrato de prata [Chahal, 2011; Lala, 2007; Pastoriza-Santos, 2009; Slistan-Grijalva, 2008].

Os compostos que têm a capacidade de impedir a aglomeração das nanopartículas chamam-se agentes estabilizantes ou dispersantes.

O borohidreto (BH_4^-) pode atuar como agente estabilizador, através de um fenómeno de adsorção à superfície das nanopartículas metálicas que se vão formando. Este fenómeno encontra-se esquematizado na figura 1.3 [Solomon, 2007].

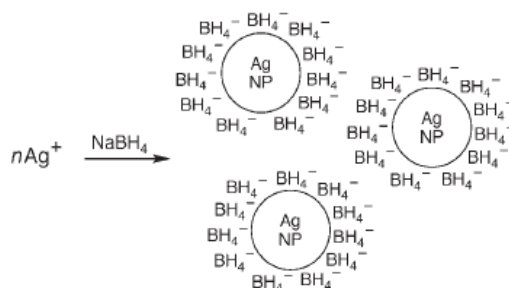


Figura 1.3: Representação esquemática da ação do BH_4^- como agente estabilizador [Solomon, 2007].

O citrato de sódio é outro dos agentes redutores muito utilizados na produção de nanopartículas metálicas de prata ou ouro, este composto também atua como agente estabilizador das nanopartículas [McFarland, 2004].

As soluções de nanopartículas podem ainda ser estabilizadas através da adição de um polímero, sendo a polivinilpirrolidona um dos mais utilizados [Popielski, 2011].

1.4. Polímeros

Os polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de unidades químicas, designadas por unidades repetitivas ou meros, ligadas entre si por ligações covalentes [Barbucci, 2002]. Os polímeros podem ser de origem natural, como a celulose, ou de origem sintética, como a policaprolactona ou a polivinilpirrolidona.

Dentro dos biomateriais os biopolímeros são uma classe importante devido à versatilidade das suas propriedades mecânicas, térmicas, químicas e óticas.

A escolha de um polímero para utilização em aplicações biomédicas tem de ter em conta a sua biocompatibilidade, para poder ser utilizado de forma segura em ambiente biológico. E também a sua biodegradabilidade, para que o polímero se degrade em produtos metabólicos e não seja necessária nenhuma intervenção para o remover do organismo [Ducheyne, 2011; Marques, 2011].

A biodegradação envolve o ataque das cadeias poliméricas pela água (por exemplo), podendo existir a intervenção de enzimas, através de dois mecanismos de erosão, a erosão superficial e a erosão volumica [Tavares, 2011].

1.4.1. Polivinilpirrolidona (PVP)

A polivinilpirrolidona é um polímero sintético, biocompatível e hidrofílico, solúvel em água [Fernandes, 2011].

O facto de ser hidrofílico faz com que seja uma boa escolha para cobertura de pele, uma vez que essa característica desempenha um papel importante na correta manutenção do exsudado. A exposição do PVP à radiação ultravioleta provoca reticulação entre as cadeias poliméricas, o que torna o polímero insolúvel [Rosa, 2011].

A sua estrutura molecular está representada na figura 1.4.

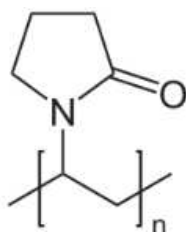


Figura 1.4: Estrutura molecular do PVP.

1.4.2. Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona é um poliéster utilizado em diversas áreas como a das matrizes para engenharia de tecidos, sistemas de libertação de fármacos, adesivos e microeletrónica.

A sua toxicidade tem sido estudada, sendo considerado não tóxico e biocompatível. O PCL é biodegradável, apresentando um tempo de degradação lento que pode ser superior a um ano. O mecanismo de degradação *in vivo* envolve a hidrólise das suas ligações éster e a ação de lipases.

Entre as suas propriedades mais relevantes destacam-se a sua hidrofobicidade, flexibilidade, elasticidade e baixo ponto de fusão (65 °C) [Abdolm ohammadi, 2012; Neto J., 2010; Tavares, 2011]. O PCL é solúvel à temperatura ambiente em clorofórmio, dimetilacetamida, acetona, ácido acético e é insolúvel em água [Marques, 2011]. A estrutura molecular do PCL está representada na figura 1.5.

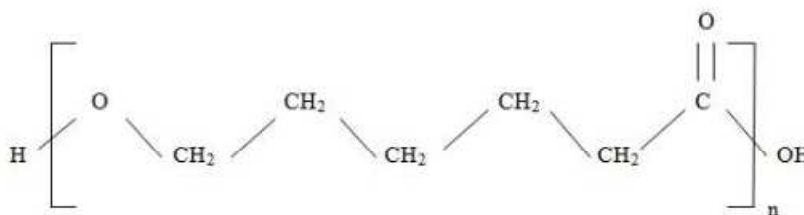


Figura 1.5: Estrutura molecular do PCL [Tavares, 2011].

1.4.3. Acetato de Celulose (AC)

O acetato de celulose é um dos ésteres da celulose, cuja estrutura molecular está representada na figura 1.6.

É um polímero biocompatível que apresenta uma fraca solubilidade na maioria dos solventes aquosos [Que, 2008].

O AC é vulgarmente utilizado na produção de membranas semipermeáveis para filtração e em aplicações biomédicas [Celebioglu, 2011; Nista, 2011].

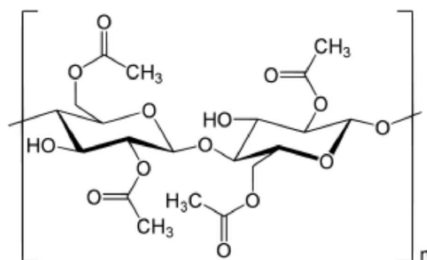


Figura 1.6: Estrutura molecular do AC.

1.5. Eletrofiação

A eletrofiação é uma técnica de produção de fibras poliméricas patenteada em 1934. Nas últimas décadas tem sido estudada e aplicada na produção de estruturas como coberturas para feridas, biossensores ou dispositivos para libertação controlada de fármacos e em áreas como a engenharia de tecidos e a microeletrónica.

Esta técnica pode ser utilizada num vasto número de diferentes soluções poliméricas, permitindo obter fibras com um diâmetro controlado que pode ir dos nanómetros aos micrómetros, e com uma grande área superficial [Bhardwaj, 2010].

Um sistema de eletrofiação, como o que se encontra representado na figura 1.7, é constituído por uma fonte de tensão, um capilar metálico (agulha colocada numa seringa) ligado à fonte de tensão, um alvo coletor ligado à terra e uma bomba infusora que controla o caudal de solução no capilar.

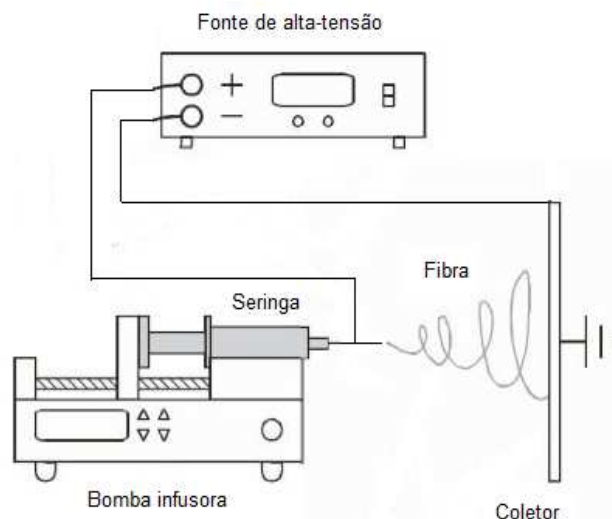


Figura 1.7: Esquema da montagem de um sistema para eletrofiação (adaptado de Tavares, 2011).

A tensão a que a agulha está sujeita, permite carregar eletricamente a solução polimérica à medida que ela vai sendo injetada pela bomba, devido ao estabelecimento de um campo electrostático entre a agulha e o coletor.

À medida que a tensão aplicada aumenta, forma-se, na ponta da agulha, uma estrutura denominada cone de Taylor. Para um valor crítico da tensão aplicada, as forças electrostáticas superam a tensão superficial no cone de Taylor, e forma-se um jacto de solução que se dirige em direção ao coletor. Neste percurso forma-se a fibra de polímero, uma vez que o solvente evapora e o jacto distende, havendo uma diminuição no seu diâmetro.

As características das fibras obtidas, como o diâmetro ou a morfologia, estão dependentes de vários parâmetros que podem ser divididos em três grupos: parâmetros do processo (tensão aplicada, caudal da solução e distância entre a agulha e o coletor); parâmetros da solução (concentração polimérica, peso molecular, viscosidade, tensão superficial e condutividade) e parâmetros ambientais (temperatura e humidade) [Fernandes, 2011; Lee, 2003].

Na tabela 1.3 são descritos alguns dos efeitos que a variação de cada dos parâmetros provoca nas fibras.

Tabela 1.3: Principais efeitos dos parâmetros da eletrofição na morfologia das fibras (adaptado de Fernandes, 2011).

Efeitos na morfologia das fibras	
<u>Parâmetros do processo</u>	
Tensão aplicada	Um aumento da tensão aplicada provoca, geralmente, uma diminuição no diâmetro das fibras.
Caudal da solução	Uma diminuição do caudal provoca uma diminuição no diâmetro das fibras.
Distância entra a agulha e o coletor	Está relacionada com o tempo de voo da fibra. O aumento da distância aumenta o tempo de voo. A escolha do tempo de voo deve ter em conta a taxa de evaporação do solvente.
<u>Parâmetros da solução</u>	
Viscosidade	Com uma viscosidade reduzida podem surgir contas. Um aumento da viscosidade provoca um aumento no diâmetro das fibras, o que contribui para o desaparecimento de contas.
Condutividade	Um aumento na condutividade provoca uma redução no diâmetro das fibras.
Tensão superficial	Uma tensão superficial elevada pode resultar na formação de contas ou de apenas gotas, em vez de um fio polimérico.
<u>Parâmetros ambientais</u>	
Temperatura	Um aumento da temperatura provoca uma diminuição na viscosidade da solução, diminuindo o diâmetro das fibras. Também provoca um aumento na taxa de evaporação do solvente, se a evaporação for muito rápida a viscosidade do jacto aumenta, dificultando o estiramento das fibras.
Humidade	A humidade afeta a taxa de evaporação das soluções polimérica, o que pode favorecer ou atrasar a solidificação do jacto e afetar a morfologia das fibras.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para a produção das soluções coloidais de nanopartículas e das membranas, assim como as diferentes técnicas utilizadas para a incorporação das nanopartículas nas membranas. Também são descritas as técnicas de caracterização utilizadas.

2.1. Métodos de produção das nanopartículas

A escolha dos métodos utilizados para produção das nanopartículas de prata e de ouro teve como principais critérios: o tempo de síntese, a toxicidade e disponibilidade dos reagentes utilizados e o tempo de estabilidade das nanopartículas nas soluções preparadas.

2.1.1. Produção das nanopartículas de prata

Foram utilizados três protocolos diferentes, em que se estudaram diferentes solventes e agentes redutores do nitrato de prata, que é a fonte de átomos de prata.

A escolha de diferentes protocolos teve como objetivo obter diferentes soluções coloidais de nanopartículas, de forma a avaliar a sua incorporação na membrana em função das características das soluções.

1º Protocolo

O primeiro protocolo utiliza o boroidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Tal como proposto por Solomon, para a preparação, da solução de nanopartículas, foi colocada a agitar num banho com gelo 30 ml de uma solução aquosa (0.002 M) de NaBH_4 (Merck) durante cerca de 20 minutos, a seguir a agitação foi interrompida e adicionou-se gota a gota 2 ml de uma solução aquosa (0.001 M) de AgNO_3 (Riedel-de Haën). Segundo o autor a solução coloidal de nanopartículas resultante matem-se estável, com uma cor amarela, durante semanas ou meses [Solomon, 2007].

Testou-se a possibilidade de sintetizar soluções coloidais com diferentes tamanhos e concentrações de nanopartículas através deste método de síntese. Isso foi testado variando a concentração de AgNO_3 e/ou de NaBH_4 nas soluções reagentes, como se encontra indicado na tabela 2.1. Foram atribuídos números às soluções coloidais resultantes, para facilitar a sua designação.